



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

204001
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 C 103/52

(22) Přihlášeno 21 04 77
(21) (PV 2657-77)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 10 05 76
(684606) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 30 06 80

(45) Vydáno 15 12 83

(72)
Autor vynálezu

ONDETTI MIGUEL ANGEL, PRINCETON a
CUSHMAN DAVID WAYNE, TRENTON (Sp. st. a.)

(73)
Majitel patentu

E. R. SQUIBB & SONS, INC., PRINCETON (Sp. st. a.)

(54) Způsob přípravy merkaptocyaminokyselin

1

Vynález se týká způsobu přípravy peptidu použitelného pro snižování hypertenze vyvolané angiotensinem.

Angiotensin II je účinné činidlo stahující cévy, o kterém bylo nalezeno, že je hlavním činidlem působícím při vzniku renovaskulární hypertenze.

Angiotensin II vzniká z angiotensinu I působením enzymu převádějícího angiotensin. Angiotensin I je biologicky inertní decapeptid, odštěpovaný z krevního proteinu angiotensinogenu působením enzymu reninu [Oparil a j. New England J. of Med., 291, 389—457 (1974)]. Angiotensinogen a renin jsou také biologicky inertní.

Angiotensin převádějící enzym je také odpovědný za inaktivaci bradykininu, vazodilatačního činidla účinného při regulaci renálních funkcí [Erdős, Circulation Research 36, 247 (1975)].

Činidla inhibující enzym převádějící angiotensin mohou tedy působit proti tlakovému účinku angiotensinu I, protože tento účinek je způsoben pouze převedením na angiotensin II. Tato činidla se mohou použít terapeuticky při léčení forem renovaskulární a zhoubné hypertenze, jakož i jiných forem hypertenze závislé na angiotensinu [Gavras aj., New England J. of Med. 291, 817 (1974)].

2

Podle práce Oparila aj. výše angiotensin II má hlavní roli při udržování cirkulační stejnoměrné stability u živočichů s vyčerpaným sodíkem, ale u normálních živočichů s normálním přísunem solí není angiotensin II vyžadován pro akutní udržování krevního tlaku. U různých stavů, které stlačují systém renin-angiotensin, akutní aplikace inhibitoru enzymu převádějícího angiotensin nebo aplikace blokátoru angiotensinu II snižuje krevní tlak a způsobuje zvýšení aktivity reninu v plasmě.

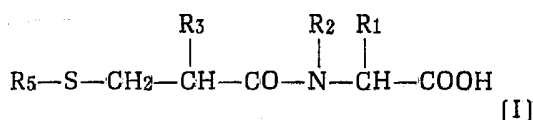
Určité merkaptocyaminokyseliny byly již uvedeny v literatuře. USA patent číslo 3 246 025 z 12. dubna 1966 nárokuje deriváty merkaptopropionylglycinu, které jsou použitelné pro zesílení funkce jater a jako antidoty pro jedy, jako jsou rtuťnaté a organoarsenité sloučeniny. Viz také DOS 2 349 707. USA patent č. 3 897 480 z 29. července 1957 uvádí použitelnost N-(α -merkaptocyaminokyselin pro profylaxi a terapii při léčení metabolických nesrovnalostí, diabetes a hepatitidy. USA patent číslo 3 857 951 z 31. prosince 1974 uvádí použití 2-merkaptopropionylglycinu a jeho solí s alkalickým kovem při léčení onemocnění dýchacího traktu.

Bylo uvedeno, že 2-merkaptopropionylglycin, používaný jako prostředek chránící

játra, snižuje krevní tlak při intravenózní injekci anestetizovaným krysám s normálním krevním tlakem [Schulze, *Arzneim. Forsch.* **22**, 1433 (1972) nespolehlivý model [Schwartz, *Methods in Pharmacology*, Vol. 1, 125 (1971)], Berger, *Selected Pharmacological Testing Methods*, Vol. 3, 171, 194 (1968)]; zatímco v ostatních pracích nebyl uveden účinek na krevní tlak, [Fujimura et al., *Nippon Yakurigaku Zasshi* **60**, 278–92 (1964)]. Viz také Ripa, *Proc. Int. Symp. Thiola*, Osaka, Japan 1970, str. 226–230, který uvedl, že u krys s normálním krevním tlakem se zvyšuje hladina angiotensinogenu a snižuje hladina reninu.

Nyní bylo nalezeno, že určité merkaptacylamínokyseliny jsou inhibitory enzymu převádějícího angiotensin a při aplikaci savcům s vysokým krevním tlakem snižují nebo odstraňují hypertensi vyvolanou angiotensinem.

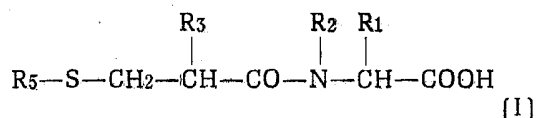
Vynález se týká určitých sloučenin použitelných pro snižování nebo odstraňování hypertense u savců. Způsob snižování krevního tlaku u hypertensních savců spočívá v tom, že se aplikuje inhibitor enzymu u převádějícího angiotensinu, vybraný ze skupiny sloučenin obecného vzorce I,



kde

R₁, R₂, R₃ a R₅ mají dále uvedený význam.

Předmětem tohoto vynálezu je způsob přípravy merkaptacylamínokyselin obecného vzorce I,

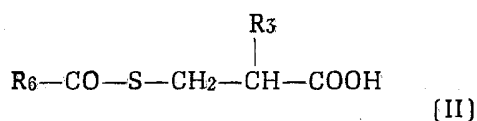


kde

R₁ je alkyl s 1 až 7 atomy uhlíku, fenylalkyl s 1 až 7 atomy uhlíku v alkyly, aminoalkyl s 1 až 7 atomy uhlíku, guanidinoalkyl s 1 až 7 atomy uhlíku v alkyly,

R₂ a R₃ jsou substituenty stejné nebo různé, a to atom vodíku, alkyl s 1 až 7 atomy uhlíku nebo benzyl, a

R₅ je atom vodíku, alkanoyl s 1 až 7 atomy uhlíku nebo benzoyl, nebo jejich soli, který se vyznačuje tím, že se nechá reagovat sloučenina obecného vzorce II,

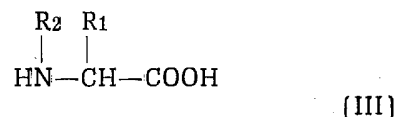


kde

R₃ má význam uvedený výše a

R₆ je alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku nebo fenyl,

s aminokyselinou obecného vzorce III



za vzniku produktu, kde R₅ je alkanoyl s 1 až 7 atomy uhlíku nebo benzoyl, popřípadě se tento produkt pak podrobí amonolyse za vzniku produktu, kde R₅ je atom vodíku, a popřípadě se sloučenina obecného vzorce I převede na sůl.

Vynález zahrnuje sloučeniny a způsob snižování nebo zmírnění hypertense způsobené renin-angiotensinem u savců, jako jsou krysy, psi apod. Tyto typy hypertense, způsobené renin-angiotensinem, zahrnují například renovaskulární hypertense a zhoubné hypertense. Vynález se tedy týká nových sloučenin popsanych výše a způsobu odstraňování nebo zmírňování hypertense vyvolané renin-angiotensinem aplikací sloučeniny nebo sloučenin vzorce I výše. Způsob zahrnuje aplikaci účinného množství inhibitoru enzymu převádějícího angiotensin vybraného ze skupiny zahrnující sloučeniny vzorce I savcům s hypertensí vyvolanou renin-angiotensinem.

Sloučeniny ze skupiny vzorce I jsou odvozené od aminokyselin nebo zahrnují struktury aminokyselin alaninu, leucinu, fenylalaninu, argininu, sarkosinu, serinu, asparaginu, lysinu, glutaminu, histidinu, tryptofanu, cysteinu, methioninu, threoninu, lysinu, tyrosinu, leucinu, valinu nebo asparagové kyseliny, a zejména výhodné jsou arginin, alanin, fenylalanin a leucin. R₅ je s výhodou atom vodíku.

Experimentální důkazy uvádějí, že N^α-(3-merkaptopropanoyl)-L-arginin, N^α-(3-merkaptopropanoyl)-L-arginin, N-(3-merkaptopropanoyl)-L-fenylalanin a N-(3-merkaptopropanoyl)-L-leucin jsou nejúčinnější výhodnou skupinou a tvoří zejména výhodný rys vynálezu.

Sloučeniny vzorce I také tvoří soli s různými anorganickými a organickými báze, které rovněž spadají do rozsahu vynálezu. Tyto soli zahrnují amonné soli, soli s alkalickými kovy, jako je sodík a draslík, soli s kovy alkalických zemin, jako je vápník a hořčík, soli s organickými báze, jako jsou například dicyklohexylamin, benzathin, hydrabamin a N-methyl-D-glukamin.

Sloučeniny podle vynálezu mají jeden nebo dva asymetrické atomy uhlíku, jestliže substituenty R₁ a R₃ jsou jiné než atom vodíku. Sloučeniny tedy existují v diastereoizomerních formách nebo v racemických směsích. Veškeré tyto sloučeniny spadají do rozsahu vynálezu.

Bylo nalezeno, že pro dosažení signifi-

kančního stupně biologické aktivity má mít asymetrický uhlík nesoucí R₁ zbytek L-konfiguraci a tato stereospecifičnost nebyla v předcházejících patentech, uvádějících merkaptacylaminokyseliny, uvedena. Sloučeniny s L-konfigurací jsou výhodné.

Inhibice enzymu převádějícího angiotensin sloučeninami vzorce I byla měřena in vitro s enzymem převádějícím angiotensin izolovaný z králičích plic postupem popsaným v práci Cushnan a Chedung [Biochem. Pharmacol., **20**, 1637 (1971)], a testem s vyříznutým hladkým svalcem [E. O'Keefe aj., Federation Proc., **31**, 511 (1972)].

Při těchto testech jsou sloučeniny silnými inhibitory stahovacího účinku angiotensinu I a potenciátory stahovacího účinku bradykininu.

Aplikací směsi obsahující jednu nebo více inhibitorů enzymu převádějícího angiotensin nebo odpovídajících fyziologicky vhodných solí hypertensnímu savci, kde hypertenze je způsobena angiotensinem, se ovlivňuje sekvence renin → angiotensin I → angiotensin II a hypertensní stav se snižuje nebo zmírňuje.

Jedna dávka nebo s výhodou dvě až čtyři rozdělené dávky denně v množství 1 až 1000 mg na kg za den, s výhodou 10 až 500 mg na kg za den, a zejména 30 až 300 mg na kg za den jsou vhodné pro snížení krevního tlaku způsobeného angiotensinem. Pokusy s živočišným modelem, které popsal S. L. Engel, T. R. Schaefer, M. H. Waugh a R. Rubin v Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **143**, 483 (1973), poskytují cenné informace. Směs se s výhodou aplikuje orálně, může se však také použít parenterální cestou, jako například podkožně, intramuskulárně, intravenózně nebo intraperitoneálně.

Sloučeniny vzorce I se používají pro zmírňování hypertenze způsobené angiotensinem a mohou se upravovat na formu tablet, kapslí nebo nálevů pro orální aplikaci. Sterilní roztoky nebo suspence se mohou použít pro parenterální aplikaci. Asi 10 až 500 mg sloučeniny nebo směsi sloučenin vzorce I nebo fyziologicky vhodné soli se smísí s fyziologicky vhodným nosičem, přísadou, pojídlem, ochranným prostředkem, stabilizátorem, ochucovadlem apod. a připraví se jednotková dávková forma vhodná pro farmaceutickou praxi. Množství aktivní sloučeniny ve směsi takové dávkové formy je v mezích dávek uvedených výše.

Příklady přísad, které se mohou přidávat do tablet, kapslí apod., jsou následující: pojídla, jako tragant, acacie, kukuřičný škrob nebo želatina, přísady jako je fosforečnan vápenatý, desintegranti činidla, jako je kukuřičný škrob, bramborový škrob, alginová kyselina apod., mazadla, jako je stearat hořečnatý, sladidla, jako je sacharosa, laktosa nebo sacharin, chuťové látky, jako je máťový olej, olej z libavky, třešňová třešť. Jestliže se jako jednotková dávková forma

používají kapsle, mohou obsahovat kromě látek výše uvedeného typu kapalné nosiče, jako jsou oleje. Různé materiály se mohou použít pro povlékání nebo jiné zvyšování farmaceutické elegance těchto preparátů. Například tablety se mohou povlékat šelakem, cukrem apod. Sirupy nebo nálevy mohou obsahovat aktivní sloučeninu, sacharosu, jako sladidla, methyl- a propylparabeny jako ochranné prostředky a barviva a chuťové látky, jako je třešť třešňová nebo pomerančová.

Sterilní směsi pro injekce se mohou připravit postupem běžně používaným ve farmaceutické praxi tak, že se rozpustí nebo suspenduje aktivní sloučenina v běžném nosiči, jako je voda pro injekce, v přírodním rostlinném oleji, jako je sesamový, kokosový, podzemnicový olej, olej z bavlníkových semen apod., nebo v syntetických tukových nosičích, jako je ethyloléat apod. Popřípadě se také mohou použít pufry, ochranné prostředky, antioxidanty apod.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech. Teploty jsou uvedeny ve stupních Celsia.

Příklad 1

N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-alanin

L-alanin (4,45 g) se rozpustí ve vodném 1 N hydroxidu sodném (50 ml) a roztok se za míchání ochladí v lázni s ledem. Přidá se postupně 2 N hydroxid sodný (27 ml) a 3-brompropionylchlorid (8,5 g), směs se vyjme z lázně s ledem a míchá se tři a půl hodiny při teplotě místnosti. Přidá se směs thiobenzoové kyseliny (7,5 g) a uhličitanu draselného (4,8 g) ve vodě (50 ml) a směs se míchá přes noc při teplotě místnosti. Po okyselení koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou se vodný roztok extrahuje ethylacetátem a organická fáze se promyje vodou, vysuší a zahustí k suchu. Odparek (14,9 g) se krystaluje z etheru a získá se 7,1 g N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-alaninu, t. t. 99 — 100°.

Příklad 2

N-(3-merkaptopropionyl)-L-alanin

N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-alanin (4,2 g) se rozpustí ve směsi vody (7,5 ml) a koncentrovaného hydroxidu amonného (6 ml). Po jedné hodině se směs zředí vodou, filtruje se a filtrát se extrahuje ethylacetátem. Vodná fáze se okyselí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a extrahuje se ethylacetátem. Organická fáze se promyje vodou, vysuší se a zahustí ve vakuu k suchu. Odparek se krystaluje ze směsi ethylacetátu a hexanu a získá se 1,87 g N-(3-merkaptopropionyl)-L-alaninu, t. t. 79 až 81°.

Příklad 3

N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-leucin

Záměnou L-leucinu (6,55 g) za L-alanin v postupu podle příkladu 1 se získá 16,7 g surového N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-leucinu. Tento materiál se rozpustí ve směsi ethylacetátu (200 ml) a dicyklohexylaminu. Krystalická sůl se filtruje a vysuší. Výtěžek 19,5 g, t. t. 178 — 180°. Dicyklohexylamoniová sůl se nechá reagovat se směsí ethylacetátu (200 ml) a 10% vodného kyselého siřičitanu draselného (50 ml). Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zahustí se k suchu ve vakuu a odparek se překrystaluje ze směsí ethylacetátu a hexanu a získá se 8,8 g čistého N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-leucinu, t. t. 99 — 101°.

Příklad 4

N-(3-merkaptopropionyl)-L-leucin

Záměnou N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-leucinu (6,46 g) za N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-alanin v postupu podle příkladu 2 se získá 2,75 g N-(3-merkaptopropionyl)-L-leucinu, t. t. 131 — 132°. Tento materiál se překrystaluje z acetonitrilu.

Příklad 5

N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-fenylalanin

Záměnou L-fenylalaninu (8,25 g) za L-alanin v postupu podle příkladu 1 se získá 18,8 g surového N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-fenylalaninu. Tento materiál se krystaluje z acetonitrilu a získá se 11,1 g produktu, t. t. 123 — 124°.

Příklad 6

N-(3-merkaptopropionyl)-L-fenylalanin

N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-fenylalanin (1,78 g) se rozpustí ve směsi vody (20 ml) a 1 N roztoku hydroxidu sodného (5,5 ml). K tomuto roztoku se přidá koncentrovaný hydroxid amonný (20 ml) a pak voda (20 ml). Po třech hodinách se reakční směs extrahuje ethylacetátem, okyselí se koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a znovu extrahuje ethylacetátem. Druhý ethylacetátový extrakt se promyje vodou, vysuší síranem hořečnatým a zahustí se ve vakuu k suchu. Odparek se chromatografuje na koloně sílikagelu směsí benzenu a kyseliny octové a získá se 0,47 g N-(3-merkaptopropionyl)-L-fenylalaninu, t. t. 106 až 107 stupňů.

Příklad 7

N^α-(3-benzoylthiopropionyl)-L-arginin

L-arginin (8,7 g) se rozpustí v 1 N vodném roztoku hydroxidu sodného (50 ml) a roztok se ochladí za míchání v lázni s ledem. Přidá se 2 N roztok hydroxidu sodného (25 ml) a přidá se 3-brompropionylchlorid (8,5 g), načež se směs odstraní z ledové lázně a míchá se dvě hodiny při teplotě místnosti. Přidá se směs thiobenzoové kyseliny (7,5 g) a uhličitanu draselného (2,4 gramu) ve vodě (10 ml) a směs se míchá přes noc při teplotě místnosti. Pak se přidá iontoměničová pryskyřice [polystyrensulfo-nová pryskyřice Dowex 50 (Mikes, Laboratory Handbook of Chromatographic Methods, Van Nostrand, 1961, str. 256)] (100 ml) a suspenze se nanese na kolonu stejné pryskyřice (300 ml). Po vymytí kyselých materiálů vodou se eluuje N^α-(3-benzoylthiopropionyl)-L-arginin pufrém pyridin-kyselina octová—voda, pH 6,5. Frakce obsahující požadovaný materiál se spojí, zahustí ve vakuu k suchu a odparek se rozmělní s etherem. Získá se 7 g produktu, t. t. 345 °C (rozk.).

Příklad 8

N^α-(3-merkaptopropionyl)-L-arginin

N^α-(3-benzoylthiopropionyl)-L-arginin (1 g) se rozpustí za intenzivního míchání ve směsi vody (5 ml) a koncentrovaného roztoku amoniaku (5 ml). Po jedné hodině se roztok extrahuje ethylacetátem a zahustí ve vakuu k suchu. Odparek se chromatografuje na koloně DEAE Sephadex [aniontová iontoměničová pryskyřice odvozená od dextranu (Mikes, výše, str. 328)] (85 ml) pufrém 0,005 M kyselého uhličitanu amonného. Frakce obsahující N^α-(3-merkaptopropionyl)-L-arginin [jak je prokázáno pozitivní thiolovou a Sakaguchi reakcí] se spojí a lyofilizací se odstraní kyselý uhličitan amonný. Výtěžek 200 mg produktu t. t. 230 °C (počátek rozkladu 200 °C).

Příklad 9

N-(3-benzoylthiopropionyl)sarkosin

Záměnou sarkosinu (4,45 g) za L-alanin v postupu podle příkladu 1 se získá 7,9 g N-(3-benzoylthiopropionyl)sarkosinu, t. t. 139—140°.

Příklad 10

N-(3-merkaptopropionyl)sarkosin

Záměnou N-(3-benzoylthiopropionyl)-

sarkosinu [2,8 g] za N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-alanin v postupu podle příkladu 2 se získá 1,65 g surového N-(3-merkaptopropionyl)sarkosinu. Tento materiál se převede na dicyklohexylamoniovou sůl (2,7 g), t. t. 157–158° a vyčištěná sůl se převede na volnou kyselinu roztřepáním mezi ethylacetát a 10% kyselý siřičitan draselný.

Příklad 11

N-(3-merkaptopropionyl)-L-serin

Záměnou L-serinu za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-serin a N-(3-merkaptopropionyl)-L-serin.

Příklad 12

N-(3-merkaptopropionyl)-L-asparagin

Záměnou L-asparaginu za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-asparagin a N-(3-merkaptopropionyl)-L-asparagin.

Příklad 13

N^α-(3-merkaptopropionyl)-L-lysin

Záměnou N^ε-terc.butyloxykarbonyl-L-lysinu [R. Schwyzer a W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **44**, 159 1961]] za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá N^α-(3-benzoylthiopropionyl)-N^ε-terc.butyloxykarbonyl-L-lysin a N^α-(3-merkaptopropionyl)-N^ε-terc.butyloxykarbonyl-L-lysin.

Reakcí tohoto materiálu s trifluoroctovou kyselinou při teplotě místnosti 15 minut se získá N^α-(3-benzoylthiopropionyl)-L-lysin a N^α-(3-merkaptopropionyl)-L-lysin.

Příklad 14

N^α-(3-merkaptopropionyl)-L-histidin

Záměnou L-histidinu za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá N^α-(3-benzoylthiopropionyl)-L-histidin a N^α-(3-merkaptopropionyl)-L-histidin.

Příklad 15

N-(3-merkaptopropionyl)glycin

Záměnou glycinu za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá (3-benzoylthiopropionyl)glycin a N-(3-merkaptopropionyl)glycin.

Příklad 16

N-(3-merkaptopropionyl)-L-tryptofan

Záměnou L-tryptofanu za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-tryptofan a N-(3-merkaptopropionyl)-L-tryptofan.

Příklad 17

N-(3-merkaptopropionyl)-L-cystein

Záměnou L-cysteinu za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-cystein a N-(3-merkaptopropionyl)-L-cystein.

Příklad 18

N-(3-merkaptopropionyl)-L-methionin

Záměnou L-methioninu za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-methionin a N-(3-merkaptopropionyl)-L-methionin.

Příklad 19

N-(3-merkaptopropionyl)-N-methyl-L-leucin

Záměnou N-methyl-L-leucinu za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá N-(3-benzoylthiopropionyl)-N-methyl-L-leucin a N-(3-merkaptopropionyl)-N-methyl-L-leucin.

Příklad 20

N^α-(3-acetylthio-2-methylpropionyl)-L-arginin

L-arginin (2,61 g) se rozpustí ve směsi uhlíčitanu sodného (3,2 g) a vody (30 ml) a roztok se ochladí v ledové lázni. 3-acetylthio-2-methylpropionylchlorid (2,7 g) se přidá k reakční směsi, která se pak míchá 1,5 hodiny při teplotě místnosti. Přidá se iontoměničová pryskyřice (AG 50W), 50 ml, a suspenze se nanese na kolonu stejné pryskyřice (80 ml). Po promytí vodou se N^α-(3-acetylthio-2-methylpropionyl)-L-arginin eluuje pufrem pyridin-kyselina octová pH 6,5, rozpouštědlo se odstraní ve vakuu, zbytek se rozpustí v methanolu a vysráží se etherem. Získá se 3,86 g N^α-(3-acetylthio-2-methylpropionyl)-L-argininu, t. t. 133°.

Příklad 21

N^α-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-arginin

N^α-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-arginin (1 g) se rozpustí ve směsi vody (5 mililitrů) a koncentrovaného amoniaku (5 mililitrů). Po jedné hodině při teplotě místnosti se roztok zahustí na 3 ml ve vakuu (bez zahřívání) a iontoměničová pryskyřice (AG—50W) se přidává, až se získá pH přibližně 4. Suspenze se nanese na kolonu stejné pryskyřice a N^α-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-argininu se eluuje pyridinacetátovým pufrům pH 6,5. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a odparek se vysuší mrazovou sublimací a získá se 0,86 g produktu t. t. 100°.

Příklad 22

N-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-valin

L-valin (88 g) a uhličitán sodný (40 g) se rozpustí ve vodě (1 liter) a roztok se ochladí v lázni s ledem za intenzivního míchání. 3-acetylthio-2-methylpropanoylchlorid (135 gramů) a roztok uhličitanu sodného (120 g) v 500 ml vody se přidají v pěti stejných dávkách během 15 minut. Po 1,5 hod. se reakční směs extrahuje ethylacetátem, vodná fáze se okyslí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a extrahuje se ethylacetátem. Organická fáze se promyje vodou, vysuší se síranem hořečnatým a zahustí se k suchu. Získá se 190 g N-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-valinu.

Příklad 23

N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-valin

N-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-valin (20 g) se rozpustí ve směsi vody (46 mililitrů) a koncentrovaného amoniaku (31 mililitrů). Po jedné hodině při teplotě místnosti se reakční směs extrahuje ethylacetátem, vodná fáze se okyslí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a extrahuje se ethylacetátem. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým a zahustí ve vakuu k suchu. Získá se 19 g N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-valinu.

Příklad 24

N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-fenylalanin

Záměnou L-fenylalaninu za L-valin postupem podle příkladu 22 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 23 se získá N-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-

-fenylalanin a N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-fenylalanin.

Příklad 25

N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-threonin

Záměnou L-threoninu za L-valin při postupu podle příkladu 22 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 23 se získá N-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-threonin a N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-threonin.

Příklad 26

N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-glutamin

Záměnou L-glutaminu za L-valin při postupu podle příkladu 22 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 23 se získá N-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-glutamin a N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-glutamin.

Příklad 27

N^α-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-lysin

Záměnou N^ε-terc.butyloxykarbonyl-L-lysinu za L-valin v postupu podle příkladu 22 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 23 se získá N^α-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-N^ε-terc.butyloxykarbonyl-L-lysin a N^α-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-N^ε-terc.butyloxykarbonyl-L-lysin. Reakcí těchto produktů s trifluoroctovou kyselinou při teplotě místnosti po dobu 15 minut se získá N^α-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-lysin a N^α-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-lysin.

Příklad 28

N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-tyrosin

Záměnou L-tyrosinu za L-valin při postupu podle příkladu 22 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 23 se získá N-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-tyrosin a N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-tyrosin.

Příklad 29

N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-tryptofan

Záměnou L-tryptofanu za L-valin při postupu podle příkladu 22 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 23 se získá N-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-

-tryptofan a N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-tryptofan.

Příklad 30

N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-methionin

Záměnou L-methioninu za L-valin při postupu podle příkladu 22 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 23 se získá N-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-methionin a N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-L-methionin.

Příklad 31

N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-N-methyl-L-fenylalanin

Záměnou N-methyl-L-fenylalaninu za L-valin postupem podle příkladu 22 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 23 se získá N-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-N-methyl-L-fenylalanin a N-(3-merkapt-2-methylpropanoyl)-N-methyl-L-fenylalanin.

Příklad 32

3-acetylthio-2-benzylpropanoylchlorid

2-benzylakrylová kyselina (8,1 g) a thiooctová kyselina (5,3 g) se smísí a zahřívají na parní lázni jednu hodinu. Po ochlazení na teplotu místnosti se přidá thionylchlorid

Příklad	I
35	glycin
36	L-alanin
37	L-valin
38	L-leucin
39	L-serin
40	L-asparagin
41	N ^ε -Boc-L-lysin
42	L-histidin
43	L-fenylalanin
44	L-tryptofan
45	L-cystein
46	L-methionin
47	sarkosin
48	N-methyl-L-leucin

Příklad 49

N-2-merkaptacetyl-L-lysin

Reakcí N^α-2-merkaptacetyl-N^ε-Boc-L-lysinu s trifluoroctovou kyselinou při teplotě místnosti po dobu 15 minut se získá N^α-2-merkaptacetyl-L-lysin.

(9,75 g) a směs se nechá stát přes noc při teplotě místnosti. Přebytek thionylchloridu se odstraní ve vakuu a destilací zbytku se získá 3-acetylthio-2-benzylpropanoylchlorid, t. v. 120 až 122°/6,7 Pa.

Příklad 33

N^α-(3-acetylthio-2-benzylpropanoyl)-L-arginin

Záměnou 3-acetylthio-2-benzylpropanoylchloridu za 3-acetylthio-2-methylpropanoylchlorid při postupu podle příkladu 20 se získá N^α-(3-acetylthio-2-benzylpropanoyl)-L-arginin, t. t. 253—259°.

Příklad 34

N^α-(3-merkapt-2-benzylpropanoyl)-L-arginin

Záměnou N^α-(3-acetylthio-2-benzylpropanoyl)-L-argininu za N^α-(3-acetylthio-2-methylpropanoyl)-L-arginin při postupu podle příkladu 21 se získá N^α-(3-merkapt-2-benzylpropanoyl)-L-arginin, t. t. 135°.

Příklady 35—48

Záměnou aminokyseliny ve sloupci I za L-alanin a chloracetylchloridu za 3-brompropionylchlorid při postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 22 se získají sloučeniny uvedené ve sloupci II.

II
N-2-merkaptacetyl-glycin
N-2-merkaptacetyl-L-alanin
N-2-merkaptacetyl-L-valin
N-2-merkaptacetyl-L-leucin
N-2-merkaptacetyl-L-serin
N-2-merkaptacetyl-L-asparagin
N ^α -2-merkaptacetyl-N ^ε -Boc-L-lysin
N-2-merkaptacetyl-L-histidin
N-2-merkaptacetyl-L-fenylalanin
N-2-merkaptacetyl-L-tryptofan
N-2-merkaptacetyl-L-cystein
N-2-merkaptacetyl-L-methionin
N-2-merkaptacetylsarkosin
N-2-merkaptacetyl-N-methyl-L-leucin

Příklad 50

N^α-2-merkaptacetyl-L-arginin

Záměnou chloracetylchloridu za 3-brompropionylchlorid při postupu podle příkladu 7 a reakcí produktu postupem podle příkladu 8 se získá N^α-2-benzoylthioacetyl-L-arginin a N^α-2-merkaptacetyl-L-arginin.

Příklady 51—64

Záměnou aminokyselin uvedených ve sloupci I za L-alanin a 2-brompropionylchlorid

Příklad	I
51	glycin
52	L-alanin
53	L-valin
54	L-leucin
55	L-serin
56	L-glutamin
57	N ^ε -Boc-L-lysin
58	L-histidin
59	L-fenylalanin
60	L-tryptofan
61	L-cystein
62	L-methionin
63	sarkosin
64	N-methyl-L-fenylalanin

Příklad 65

N^ε-2-merkaptopropanoyl-L-lysin

Reakcí N^ε-2-merkaptopropanoyl-N^ε-Boc-L-lysinu s trifluoroctovou kyselinou při teplotě místnosti po dobu 15 minut, se získá N^ε-2-merkaptopropanoyl-L-lysin.

Příklad 66

N^ε-2-merkaptopropanoyl-L-arginin

Záměnou 2-brompropionylchloridu za 3-brompropionylchlorid při postupu podle příkladu 7 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 8 se získá N^ε-2-benzoylthiopropionoyl-L-arginin a N^ε-2-merkaptopropanoyl-L-arginin.

Příklad 67

N^ε-4-merkaptobutanoyl-L-arginin

Záměnou 4-chlorbutyrylchloridu za 3-brompropionylchlorid při postupu podle příkladu 7 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 8 se získá N^ε-4-benzoylthiobutanoyl-L-arginin a N^ε-4-merkaptobutanoyl-L-arginin.

Racemické formy konečných produktů v každém z předcházejících příkladů vznikají použitím DL forem výchozích aminokyselin místo L-forem.

Obdobně D-formy konečných produktů v každém z předcházejících příkladů vznikají použitím D-forem výchozích aminokyselin místo L-forem.

Příklad 68

N^ε,N^{ε'}-[dithio-3,3'-bis(2-methylpropanoyl)]bis-L-arginin

ridu za 3-brompropionylchlorid při postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získají sloučeniny uvedené ve sloupci II.

II
N-2-merkaptopropanoylglycin
N-2-merkaptopropanoyl-L-alanin
N-2-merkaptopropanoyl-L-valin
N-2-merkaptopropanoyl-L-leucin
N-2-merkaptopropanoyl-L-serin
N-2-merkaptopropanoyl-L-glutamin
N ^ε -2-merkaptopropanoyl-N ^ε -Boc-lysin
N-2-merkaptopropanoyl-L-histidin
N-2-merkaptopropanoyl-L-fenylalanin
N-2-merkaptopropanoyl-L-tryptofan
N-2-merkaptopropanoyl-L-cystein
N-2-merkaptopropanoyl-L-methionin
N-2-merkaptopropanoylsarkosin
N-2-merkaptopropanoyl-N-methyl-L-fenylalanin

N^ε-(3-merkaptopropanoyl)-L-arginin se rozpustí ve vodě a pH se upraví na 7 přidáním 1N roztoku hydroxidu sodného. 0,5M roztok jodu v 95% ethanolu se pak přikapává k roztoku, přičemž pH se udržuje mezi 6 a 7 pečlivým přidáváním 1N roztoku hydroxidu sodného. Jakmile vznikne stálé žluté zbarvení (5 min.), přeruší se přidávání jodu, zbarvení se odstraní přidáním thiosíranu sodného a roztok se zahustí ve vakuu na jednu desetinu původního objemu. Vzniklý roztok se nanese na kolonu iontoměničové pryskyřice Dowex 50 a N^ε,N^{ε'}-[dithio-3,3'-bis(2-methylpropanoyl)]bis-L-arginin se eluuje pyridinacetátovým pufrům, pH 6,5.

Příklad 69

N,N'-[dithio-3,3'-bis(2-methylpropanoyl)]bis-L-valin

N-(3-merkaptopropanoyl)-L-valin se rozpustí ve vodě a 1N hydroxidem sodným se upraví pH na 7. Pak se přidává 0,5M roztok jodu v 95% ethanolu, přičemž se opatrným přidáváním 1N hydroxidu sodného pH udržuje mezi 6 a 7. Jakmile vznikne stálé žluté zbarvení (5 minut), přeruší se přidávání jodu a žluté zbarvení se odstraní thiosíranem sodným. Vodný alkoholický roztok se okyslí 1N roztokem kyseliny chlorovodíkové a ethylacetátem se extrahuje N,N'-[dithio-3,3'-bis(2-methylpropanoyl)]bis-valin.

Příklad 70

N-(3-merkaptopropanoyl)-N-benzylglycin

Záměnou N-benzylglycinu za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá

N-(3-benzoylthiopropionyl)-N-benzylglycin a N-(3-merkaptopropionyl)-N-benzylglycin.

Příklad 71

N-(3-merkaptopropionyl)-N-benzyl-L-leucin

Záměnou N-benzyl-L-leucinu za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá N-(3-benzoylthiopropionyl)-N-benzyl-L-leucin a N-(3-merkaptopropionyl)-N-benzyl-L-leucin.

Příklad 72

N-(3-merkaptopropionyl)-L-asparagová kyselina

Záměnou L-asparagové kyseliny za L-alanin v postupu podle příkladu 1 a pak reakcí produktu postupem podle příkladu 2 se získá N-(3-benzoylthiopropionyl)-L-asparagová kyselina a N-(3-merkaptopropionyl)-L-asparagová kyselina.

Příklad 73

1000 tablet obsahujících po 100 mg N-(3-merkaptopropionyl)-L-fenylalaninu se připraví z následujících složek:

N-(3-merkaptopropionyl)-L-fenylalaninu	100 g
kukuřičného škrobu	50 g
želatiny	7,5 g
avicelu (mikrokrystalická celulóza)	25 g
stearátu hořečnatého	2,5 g

N-(3-merkaptopropionyl)-L-fenylalanin a kukuřičný škrob se smísí s vodným roztokem želatiny. Směs se vysuší a roztmele na jemný prášek. Avicel a pak stearát hořečnatý se přimísí a provede se granulace. Granulát se vylisuje do tablet a získá se 1000 tablet obsahujících po 100 mg aktivní složky.

Příklad 74

1000 tablet z nichž každá obsahuje po 200 mg N-2-merkaptopropionylglycinu se připraví z následujících složek:

N-2-merkaptopropionylglycinu	200 g
laktosy	100 g
avicelu	150 g
kukuřičného škrobu	50 g
stearátu hořečnatého	5 g

N-2-merkaptopropionylglycin, laktosa a avicel se smísí a pak se přidá kukuřičný škrob a nato stearát hořečnatý. Suchá směs se vylisuje do tablet a získá se 1000

tablet, z nichž každá má hmotnost 505 mg a obsahuje po 200 mg aktivní složky. Tablety se povléknou roztokem Methocelu E15 (methylelulosa) a barevného laku, obsahujícího žluť č. 6.

Příklad 75

Injektivatelný roztok se připraví z následujících složek:

N-(3-merkaptopropionyl)-L-fenylalaninu	500 g
methylparabenu	5 g
propylparabenu	1 g
chloridu sodného	25 g
vody pro injekce, qs.	5 l

Aktivní složka, ochranné látky a chlorid sodný se rozpustí v 3 litrech vody pro injekce a pak se upraví celkový objem na 5 litrů. Roztok se filtruje přes sterilní filtr a asepticky se plní do sterilních lékovek, které se uzavřou předsterilizovanými gumovými zátkami. Každá lékovka obsahuje 5 ml roztoku, obsahujícího 100 mg aktivní složky na ml roztoku pro injekce.

Příklad 76

I když konverze angiotensinu I na angiotensin II enzymem převádějícím angiotensin je pravděpodobně nejdůležitější v patologii hypertenze, aktivita izolovaného enzymu se s výhodou přesněji měří rychlost štěpení jednoduššího peptidického substrátu hippuryl-L-histidyl-L-leucinu. Pro stanovení I_{50} hodnot (koncentrace sloučeniny vyjádřená v mikrogramech/ml, způsobující 50% inhibici enzymu převádějícího angiotensin) různých koncentrací každé sloučeniny se do zkumavek 13×100 mm přidávají následující složky tak, že je uvedena konečná koncentrace v konečném objemu 0,25 ml: 100 mM draselného fosfátového pufru pH 8,3, 300 mM chloridu sodného, 5 mM hippuryl-L-histidyl-L-leucinu a 5 milijednotek enzymu převádějícího angiotensin, připraveného z králíčích plic. Kontroly neobsahují inhibitor (100% účinek) a které byly před přidáním enzymu okyseleny (0% účinek se připraví obdobně. Veškeré enzymatické reakce se iniciují přidáním enzymu. Zkumavky se inkubují 30 minut při 37 °C a reakce se ukončí přidáním 0,25 ml 1 N kyseliny chlorovodíkové. Kyselina hippurová vzniklá reakcí enzymu převádějícího angiotensin na hippuryl-L-histidyl-L-leucin se extrahuje do ethylacetátu, extrakt se odpaří k suchu, znovu se rozpustí ve vodě a kvantita se určí z absorbance při 228 nm. Procento inhibice při každé koncentraci sloučeniny se vypočte srovnáním s kontrolními aktivitami při 0 a 100 %. Koncentrace reprezentativních sloučenin podle vynálezu, které inhibují účinek enzymu převádějícího angiotensin z 50 %, jsou uvedeny v následující tabulce:

Sloučenina podle příkladu	I ₅₀ (μg/ml)
2	1,2
4	1,8
6	0,86
8	0,17
10	1,8
15	2,0
51	2,0

Příklad 77

Postup pro stanovení inhibice enzymu převádějícího angiotensin I ve vyřiznutém ileu morčat se provádí následujícím způsobem: K vyřiznutému ileu v lázni Krebsova roztoku se přidají různé koncentrace sloučeniny, směs se provzdušní směsí 95 % O₂ a 5 % CO₂. Po dvou minutách se přidá angiotensin I [25 g/ml] a měří se isotonická kontrakce. Koncentrace reprezentativních sloučenin podle vynálezu (v mikrogramech na ml), které inhibují účinek angiotensinu

I z 50 % (IC₅₀), jsou uvedeny v následující tabulce:

Sloučenina podle příkladu	IC ₅₀ (μg/ml)
2	0,94
4	2,0
6	0,52
8	0,9
10	0,94
15	4,5
34	4,1
51	2,0

Příklad 78

Reprezentativní sloučeniny podle vynálezu se aplikují orálně neanesthetizovaným samcům krys kmene Sprague-Dawley o hmotnosti asi 200 g, načež se jim injikuje 0,31 μg/kg angiotensinu I. V následující tabulce je uveden stupeň získané inhibice.

Sloučenina podle příkladu	Dávka mg/kg	Počet zvířat	% maximální inhibice angiotensinu I tlak ± SE
15	10	2	34,2±6,7 %
	100	2	61,5±1,2 %
51	10	2	29,9±3,1 %
	30	2	52,9±15,8 %
	100	2	64,9±12,3 %

Příklad 79

Samci krys NC Nelson kmene se anestetizují etherem a každému se levá renální arterie částečně stáhne stříbrnou svorkou (0,22 mm). Pravá ledvina a renální arterie se ponechají nedotčeny. Tento model se běžně označuje jako „2-kidney Goldblatt renal hypertensive rat“ a považuje se za typický pro hypertensi závislou na renin-angiotensin reakci [Gavras aj., Science 188,

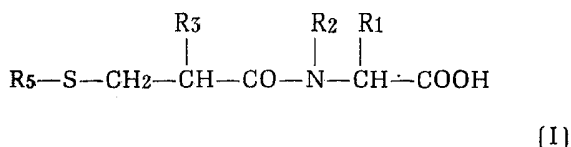
1316 [1975]]. Abdominální aorta se 5 týdnů po podvázání propojí trubičkou s levou renální arterií. Jeden týden po propojení se sleduje přímo průměrný krevní tlak a rychlost srdce, po dobu 4 a 8 hodin, a během této doby se každých 24 hodin po dva po sobě jdoucí dny dává 300 mg sloučeniny podle příkladu 51. Následující tabulka udává snížení krevního tlaku u dvou různých krys druhý den dávkování.

	Průměrný krevní tlak kPa	
	krysa 9	krysa 10
Před aplikací	29,6	27,5
po aplikaci		
1 h	27,5	27,1
2 h	23,1	25,3
3 h	20,1	25,2
4 h	24,5	26,5
5 h	27,5	26,0
6 h	26,5	26,3

Jestliže se stejná dávka aplikuje orálně krysám s normálním krevním tlakem, nebyl pozorován žádný účinek na krevní tlak.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy merkptoacylaminokyseliny obecného vzorce I,

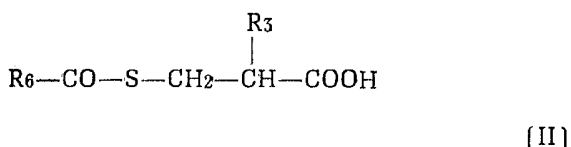


kde

R₁ je alkyl s 1 až 7 atomy uhlíku, fenylalkyl s 1 až 7 atomy uhlíku v alkylu, aminoalkyl s 1 až 7 atomy uhlíku, guanidinoalkyl s 1 až 7 atomy uhlíku v alkylu,

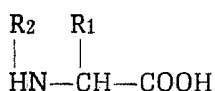
R₂ a R₃ jsou substituenty stejné nebo různé, a to atom vodíku, alkyl s 1 až 7 atomy uhlíku nebo benzyl, a

R₅ je atom vodíku, alkanoyl s 1 až 7 atomy uhlíku nebo benzoyl, nebo jejich soli, vyznačený tím, že se nechá reagovat sloučenina obecného vzorce II,



kde

R₃ má význam uvedený výše, a R₆ je alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku nebo fenyl, s aminokyselinou obecného vzorce III



(III)

za vzniku produktu, kde R₅ je alkanoyl s 1 až 7 atomy uhlíku, nebo benzoyl, popřípadě se tento produkt pak podrobí amonolyse za vzniku produktu, kde R₅ je atom vodíku, a popřípadě se sloučenina obecného vzorce I převede na sůl.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se vychází ze sloučeniny obecného vzorce III, kde R₁ je guanidinopropyl, aminopropyl, aminobutyl, fenylmethyl nebo isobutyl a R₂ má význam uvedený v bodě 1.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se vychází ze sloučenin obecných vzorců II a III, kde R₁ je fenylmethyl, R₃ je atom vodíku a R₂ a R₅ mají význam uvedený v bodě 1.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se vychází ze sloučenin obecných vzorců II a III, kde R₁ je isobutyl, R₃ je atom vodíku a R₂ a R₅ mají význam uvedený v bodě 1.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se vychází ze sloučenin obecných vzorců II a III, kde R₁ je guanidinopropyl, R₃ je atom vodíku a R₂ a R₅ mají význam uvedený v bodě 1.